

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学

号

:

21720081152524

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

# 不同光照和温度条件下中肋骨条藻休眠孢子萌发中氮代谢过程的初步研究

The primary study on the nitrogen metabolism of  
*Skeletonema costatum* resting spores during germination  
under different light intensity and temperature

李 青 俞

指导教师姓名: 陈长平

专 业 名 称: 水生生物学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
缩 略 词.....	IV
第一章 前 言 .....	1
1.1 硅藻休眠孢子的研究进展.....	1
1.2 中肋骨条藻的研究进展.....	2
1.3 氨基酸分析方法研究进展.....	5
1.3.1 直接分析法 .....	5
1.3.2 液相色谱衍生化间接法 .....	5
1.3.3 气相色谱法 .....	7
1.3.4 气相色谱-质谱方法检测氨基酸 .....	8
1.4 稳定同位素技术研究进展.....	8
1.4.1 稳定同位素的检测技术.....	9
1.4.2 氮稳定同位素在海洋生物学研究的应用.....	10
1.5 硅藻尿素循环.....	11
1.6 本论文的研究目的和意义.....	13
第二章 材料与方 法.....	15
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 实验藻种.....	15
2.1.2 主要仪器.....	15
2.1.3 主要实验试剂.....	16

2.1.4 主要培养基.....	16
<b>2.2 实验方法 .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 中肋骨条藻休眠孢子的诱导.....	17
2.2.2 中肋骨条藻休眠孢子萌发.....	17
2.2.3 氨基酸测定.....	18
2.2.4 氮稳定同位素添加实验.....	19
2.2.5 氨基酸稳定同位素标记实验.....	20
<b>第三章 结果.....</b>	<b>23</b>
3.1 中肋骨条藻休眠孢子萌发过程.....	23
3.2 光照对中肋骨条藻休眠孢子萌发影响.....	25
3.2.1 不同光照强度对休眠孢子萌发时硝态氮吸收的影响.....	25
3.2.2 不同光照强度对休眠孢子萌发时胞内游离氨基酸的影响.....	26
3.3 温度对中肋骨条藻休眠孢子萌发影响.....	31
3.3.1 不同温度对休眠孢子萌发时硝态氮吸收的影响.....	31
3.3.2 不同温度条件下中肋骨条藻休眠孢子萌发的游离氨基酸的变化...32	
3.4 GC-MS 分析 $^{15}\text{N}$ 标记的氨基酸结果 .....	36
<b>第四章 讨论.....</b>	<b>42</b>
4.1 氨基酸分析方法 .....	43
4.2 光照对休眠孢子游离氨基酸的变化及氮吸收的影响.....	45
4.3 温度对休眠孢子游离氨基酸的变化及氮吸收的影响.....	46
4.4 中肋骨条藻休眠孢子对外源硝态氮利用.....	48
4.5 氨基酸在中肋骨条藻逆境胁迫过程的重要作用.....	49
4.6 尿素循环中关键氨基酸在休眠孢子萌发中的变化.....	51

第五章 小结与展望.....	55
5.1 主要研究成果.....	55
5.2 本研究的创新点.....	56
5.3 展望.....	57
参考文献.....	58
附 图.....	70
研究生期间参与课题及发表论文.....	75
致 谢 .....	76

## Content

<b>CHINESE ABSTRACT .....</b>	<b>I</b>
<b>ENGLISH ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>ABBREVIATIONS .....</b>	<b>IV</b>
<b>Chapter 1: Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 The research of diatom resting spores .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Review on the research of <i>Skeletonema costatum</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Review on analysis methods of amino acids .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Direct analysis methods .....	5
1.3.2 Liquid chromatography .....	5
1.3.3 Gas chromatography .....	7
1.3.4 GC-MS analysis amino acids .....	8
<b>1.4 Review of Stable isotopes technology .....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Detecting techniques of stable isotopes .....	9
1.4.2 Nitrogen stable isotopes applications in Marine Biology .....	10
<b>1.5 Review of the research on the urea cycle of diatom .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 The objective and significance of this study .....</b>	<b>13</b>
<b>Chapter 2. Material and Methods .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Research material .....	15
2.1.2 Main instruments and equipments .....	15
2.1.3 Main reagents .....	16

2.1.4 The main medium .....	16
<b>2.2 The methods .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 The induction methods of <i>Skeletonema costatum</i> resting spores .....	17
2.2.2 The germination of <i>Skeletonema costatum</i> resting spores.....	17
2.2.3 Analysis of amino acid.....	18
2.2.4 Nitrogen stable isotopes add experiment .....	19
2.2.5 Studies on stable isotope-labeling amino acids.....	20
<b>Chapter 3. Results.....</b>	<b>23</b>
3.1 The germination process of <i>Skeletonema costatum</i> resting spores.....	23
3.2 The effects of light intensity on <i>Skeletonema costatum</i> resting spores germination .....	25
3.2.1 Nitrogen uptake in germination process of resting spores under different light intensity.....	25
3.2.2 The changes of free amino acid in germination process of resting spores under different light intensity .....	26
3.3 The effects of temperature on <i>Skeletonema costatum</i> resting spores germination .....	31
3.3.1 Nitrogen uptake in germination process of resting spores under different temperature.....	31
3.3.2 The changes of free amino acid in germination process of resting spores under different temperature .....	32
3.4 GC-MS analysis the <sup>15</sup> N stable isotope-labeling amino acids .....	36
<b>Chapter 4. Discussion .....</b>	<b>42</b>
4.1 Analysis methods of amino acids.....	43



4.2 The effects of light on free amino acid and nitrogen uptake in the spores germination process.....	45
4.3 The effects of temperature on free amino acid and nitrogen uptake in the spores germination process .....	46
4.4 Nitrogen utilization of <i>Skeletonema costatum</i> resting spores during germination .....	48
4.5 The important role of amino acid in the responses of <i>Skeletonema costatum</i> to adverse stresses .....	49
4.6 The changes of the key free amino acid of urea cycle in germination process of resting spores.....	51
<b>Chapter 5. Conclusion and Prospect.....</b>	<b>55</b>
5.1 The results of this study .....	55
5.2 Research originality.....	56
5.3 Advice for future study.....	57
<b>References .....</b>	<b>58</b>
<b>Attached diagram .....</b>	<b>70</b>
<b>Papers and participated research projects .....</b>	<b>75</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>76</b>

## 中文摘要

硅藻休眠孢子是一类重硅质化的形态上不同于营养细胞的细胞。一般情况，硅藻休眠孢子被认为是硅藻越冬的形式，从而为条件适宜时大量繁殖提供种源。但目前对于硅藻休眠孢子萌发过程及氮代谢过程不甚明了，对其生态功能也不十分清楚。

本研究对中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)休眠孢子萌发过程中氮利用及游离氨基酸的变化进行了研究。利用同位素示踪技术及质谱仪分析了萌发中的中肋骨条藻对外源硝态氮的吸收；利用高效液相色谱法分析了萌发过程中中肋骨条藻胞内游离氨基酸的动态变化；利用  $^{15}\text{N}$  稳定同位素标记及气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析了外源硝态氮的利用及其在氨基酸的生物合成中的作用。结果如下：

(1) 萌发过程中细胞体积不断增大，直至萌发后 48h。细胞在 48~54h 内基本完成第一次分裂。光照是启动中肋骨条藻休眠孢子的关键。无光条件下，即使温度升高也不足以启动中肋骨条藻休眠孢子的萌发。

(2) 光照强度越大中肋骨条藻细胞氮吸收速率越大，尤其是萌发起始阶段。

(3) 高光照强度能明显增加中肋骨条藻休眠孢子萌发过程中胞内游离氨基酸的种类及含量。

(4) 温度对休眠孢子氮吸收在萌发各个时期表现不一样，但对氮吸收速率影响不及光照大。

(5) 温度对中肋骨条藻休眠孢子萌发过程中氨基酸含量的影响结果表明，游离氨基酸的含量总体趋势为 26℃组 > 23℃组 > 29℃组。26℃培养条件下的中肋骨条藻休眠孢子萌发开始 6h 后，胞内游离氨基酸的含量显著高于其它两组。

(6)  $^{15}\text{N}$  同位素标记示踪实验结果表明， $^{15}\text{N}$  主要标记在 Glu、His、Ala、Gly、Pro、Thr 这 6 种氨基酸上，说明这 6 种氨基酸在休眠孢子萌发过程中的外源氮同化中起重要作用。

(7) 甘氨酸 (Gly) 和组氨酸 (His) 是中肋骨条藻休眠孢子萌发过程的优势游离氨基酸。对比对数期、稳定期及萌发过程的中肋骨条藻，发现甘氨酸和组氨酸与中肋骨条藻应对逆境胁迫有关。

**关键词：**中肋骨条藻；休眠孢子；稳定同位素

## Abstract

Diatom resting spores are heavily silicified cells that are morphologically distinct from vegetative cells. As “seed bank”, they overwinter in the sediment and could provide seed for subsequent blooms when conditions become favorable. However, there is a paucity of information on their germination process in natural environments and the ecological function of diatom resting stage cells is also mysterious.

Nitrogen utilization and free amino acids changes were examined in germinating spores of *Skeletonema costatum* under different light intensity and temperature. Nitrogen uptake was analyzed using  $^{15}\text{N}$  stable isotopic labeling with mass spectrometric detection. HPLC-based analysis was used to dynamic tracking of free amino acid changes. GC-MS analysis was used to dynamic tracking of free amino acids biosynthesis after  $^{15}\text{NO}_3$  being uptake by spores. The main results were showed as follows:

(1) The cell size increased gradually until 48h during the process of resting spores germination in *Skeletonema costatum*. The first cell division occurred in 48~54h. Our results showed that light intensity played a key role in *Skeletonema costatum* resting spores germination. Despite of the increasing temperature, resting spores can germinate only under light condition.

(2) The greater the light intensity was, the greater the nitrogen absorption rate was, especially in initial stages of germination. Compared to the temperature, the effect of light intensity on the nitrogen uptake rate is more important.

(3) The amount of free amino acid increased obviously under high light intensity.

(4) Effect of different temperature on the nitrogen uptake during the *Skeletonema costatum* resting spores germination process were quite different.

(5) In temperature experiments, the concentration of free amino acid was highest in 26°C groups, followed by 23°C groups and 29°C groups. Total amino acid of the 26°C group was higher than those of the other two group's after 6h.

(6) Our experiment results showed that  $^{15}\text{N}$  stable isotopes is mostly labelled on His、Ala、Glu、Gly、Pro、and Thr. It indicates that the six amino acids play an

important roles in *Skeletonema costatum* resting spores nitrogen assimilation process.

(7) The dominant free amino acid in spores germinating process was Gly and His. Compared to resting spores with stationary phase cells and logarithmic phase cells , it is found that Gly and His could be involved in the response of *Skeletonema costatum* to adversity stress

**Key words:** *Skeletonema costatum*; resting spore ; stable isotop

## 缩 略 词

中文名	英文名	单字母符号	三字母符号
丙氨酸	Alanine	A	Ala
精氨酸	Arginine	R	Arg
天冬酰胺	Asparagine	N	Asn
天冬氨酸	Aspartic acid	D	Asp
半胱氨酸	Cysteine	C	Cys
谷氨酰胺	Glutamine	Q	Gln
谷氨酸	Glutamic acid	E	Glu
甘氨酸	Glycine	G	Gly
组氨酸	Histidine	H	His
异亮氨酸	Isoleucine	I	Ile
亮氨酸	Leucine	L	Leu
赖氨酸	Lysine	K	Lys
蛋氨酸	Methionine	M	Met
苯丙氨酸	Phenylalanine	F	Phe
脯氨酸	Proline	P	Pro
丝氨酸	Serine	S	Ser
苏氨酸	Threonine	T	Thr
色氨酸	Tryptophan	W	Trp
酪氨酸	Tyrosine	Y	Tyr
缬氨酸	Valine	V	Val
瓜氨酸	Citrulline	无	Cit
鸟氨酸	Ornithine	无	Orn

**HPLC:**High Performance Liquid Chromatography (高效液相色谱)

**GC-MS:** Gas Chromatography–Mass Spectrometry (气相色谱-质谱联用)

**AQC:**6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯) . **MTBSTFA:**N-(tert-Butyldimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamide (N-(特丁基二甲基硅)-N-甲基三氟乙酰胺) . **DMF:** N,N-dimethylformamide (N,N-二甲基甲酰胺)

## 第一章 前言

早在白垩纪硅藻即已出现。它们盛行于新生代，不断繁衍至今。硅藻是单细胞光合自养真核生物，大约有 250 属 10 万种。它们不仅拥有各种变幻莫测的外部形态，而且它们亦有巧夺天工般的精巧的硅质细胞壁。它们是水生生物资源的重要组成部分，也是主要的初级生产者之一，在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着极其重要的作用。它们被誉为“水中牧草”，其初级生产力占全球初级生产力的 20%，占海洋初级生产力的 40%<sup>[1]</sup>，是生物地球化学循环中多种重要生源要素的固定者，其在全球碳循环中的作用可媲美热带雨林<sup>[2-3]</sup>。

### 1.1 硅藻休眠孢子的研究进展

硅藻在生长环境发生变化时的一种特殊的繁殖方式和生存适应现象就是形成休眠孢子。休眠孢子是海洋硅藻中心纲硅藻和某些淡水硅藻、羽纹纲硅藻生活史中出现的重硅质化阶段。休眠孢子在形态学上类似但生理学上不同于营养细胞<sup>[4-5]</sup>。研究硅藻休眠孢子有多方面的意义。硅藻休眠孢子的形成和重新萌发常常会影响水域的初级生产力，并且能反映生态环境某些理化条件的变化。研究硅藻休眠孢子有多方面的意义。沉积物中的硅藻休眠期细胞的类群对水域中硅藻种类循环、演替和群落生态分布起重要的作用<sup>[6-9]</sup>。Itakura等研究了日本广岛海湾底部沉积物时发现，沉积物中的硅藻的休眠孢子类似于陆地植物的“种子库”，不仅可以保证硅藻在复杂多变的沿岸海域中得以幸存，同时也是近岸海域赤潮爆发的种源<sup>[10]</sup>。因此，可以通过底质硅藻休眠孢子种类、数量及分布调查，可以一定程度上反映出该地区浮游硅藻群落分布特点以及可能的演替方向；沉积物中休眠细胞与藻华之间存在密切关系<sup>[10-11]</sup>，可为准确预测硅藻引发的藻华提供了一定的科学依据。对硅藻休眠孢子的形态学和生态学进行研究，在硅藻分类学和生态学都有重要的意义。此外对硅藻休眠孢子的研究在实际应用中亦有重要的意义，如饵料硅藻保种等<sup>[11-13]</sup>。利用常规的显微镜技术不容易区分沉积物中硅藻休眠孢子存活与否，故对硅藻休眠孢子的研究还存在一定技术难度<sup>[10]</sup>。国外对硅藻休眠孢子的研究较早，对硅藻休眠状态的细胞做了大量的研究后认为硅藻休眠孢子是硅藻越冬的形式，为条件适宜时大量繁殖提供种源<sup>[10, 14-18]</sup>。我国对硅藻休眠孢子的研究起步较晚，发表的文献资料以研究某些休眠孢子的形态学和生态学等方面

居多，而且休眠孢子萌发这一生物学过程涉所及的生化过程知之甚少。

一般认为，硅藻细胞在处于氮、磷、硅等大量营养元素（尤其是氮元素）的限制、光照强度减弱、盐度和温度的波动等不利生存条件时，会诱导硅藻形成休眠孢子或休眠细胞。这种观点认为硅藻休眠孢子的产生是环境压力所致。但王团老等研究紧密角管藻的两种类型的休眠孢子后认为有性休眠孢子的形成并非环境压力所致，而是硅藻有性生殖周期中不可或缺的发生阶段<sup>[19]</sup>。关于硅藻休眠孢子的形成有许多的假说如Gran氏假说、营养胁迫假说、系统发育假说、沉降假说、生存适应假说、系统发育假说、重新萌发假说等。这些假说都在一定程度、一定范围内解析了硅藻休眠孢子形成的原因，但是都存在一定的局限性<sup>[12]</sup>。

## 1.2 中肋骨条藻的研究进展

中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 隶属于硅藻门 (Bacillariophyta) 中心纲 (Centricae) 盘状硅藻目 (Discoidales) 骨条藻科 (Skeletonemaceae) 骨条藻属 (*Skeletonema*) 的一种单细胞浮游植物(图1.1)。中肋骨条藻为广温广盐性世界性广布种，在近岸低盐水域（盐度低于31.5‰）及河口海域尤其茂盛，是重要的沿岸流指示生物。

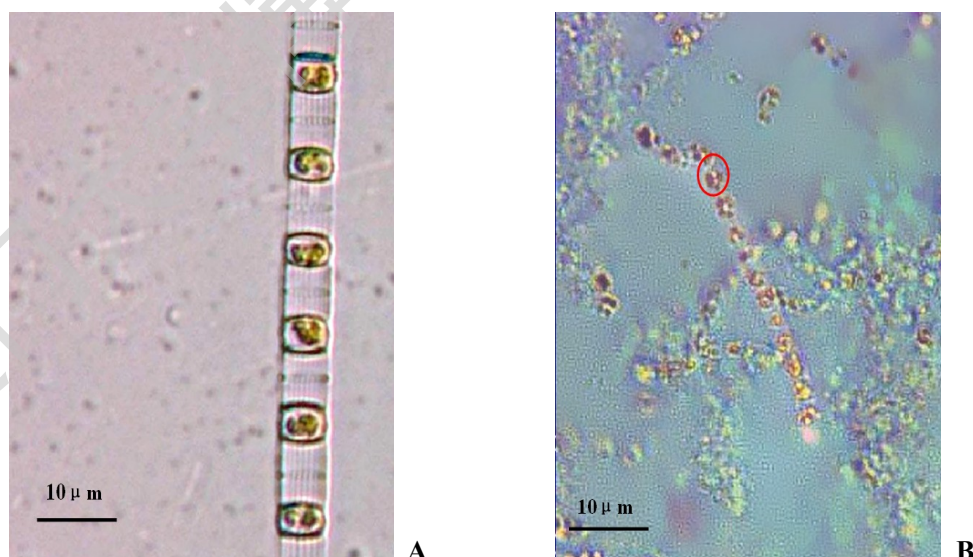


图 1.1 中肋骨条藻细胞形态

A-营养细胞 B-休眠孢子

Fig. 1.1 *Skeletonema costatum* cells morphology

A- Vegetative cells B-resting spores

程兆第等对中肋骨条藻进行了形态及亚显微镜结构特征的观察和描述<sup>[20]</sup>。史亚波描述了中肋骨条藻和热带骨条藻的形态和生理生态特征差异<sup>[12, 21]</sup>。Medlin等通过小亚基核糖体DNA序列分析,在分子水平上对中肋骨条藻进行了鉴定<sup>[22]</sup>。韩天笑等研究了不同地理株中肋骨条藻生长特性,并且用随机引物对其基因组DNA进行P C R扩增,分析了随机扩增DNA多态性<sup>[23]</sup>。程金凤等对骨条藻的种类与基因多样性研究进展进行了阐述<sup>[21]</sup>。中肋骨条藻因其作为重要海洋经济生物和近岸主要赤潮种类之一而备受研究者关注。

中肋骨条藻是重要的饵料生物,是海洋浮游动物(包括大型底栖生物和游泳生物的幼体)重要饵料<sup>[24-27]</sup>。例如,中肋骨条藻在重要经济水产虾类的养殖上起重要作用<sup>[28-30]</sup>。中肋骨条藻在我国近海广泛分布,尤其是近年来近岸陆源污染、海水富营养化日益加重,常形成中肋骨条藻为优势种的赤潮,是我国常见的赤潮藻<sup>[31-34]</sup>。中肋骨条藻形成赤潮与诸多因素有关,是生物、化学和物理等因子综合作用的结果。生物因子包括赤潮“种子库”存在、其它浮游生物的竞争及化感作用、水生动物的摄食等。化学因子主要是指各种营养因子如氮、磷、硅等营养盐和微量元素。物理因子包括光照、温度、水文条件和气候等方面。

中肋骨条藻要形成赤潮,其基础密度要达到  $5 \times 10^5 \text{ cells/L}$ <sup>[34]</sup>。要到达如此高的密度,中肋骨条藻营养细胞本身迅速繁殖是一个方面,另外一方面就是赤潮“种子库”休眠孢子的重新再萌发。沈竑等在对长江口中肋骨条藻赤潮发生群过程调查研究发现,在赤潮发生的维持阶段后期和消亡阶段有5~7.8%的中肋骨条藻形成了休眠孢子。整个中肋骨条藻细胞群体链上所有细胞形成的休眠孢子是同步的,且一个中肋骨条藻细胞仅形成一个休眠孢子。并且认为这些休眠孢子的再萌发和中肋骨条藻营养细胞本身的高繁殖力可能在短时间内引发赤潮,引起水体变色<sup>[35]</sup>。

氮是所有浮游植物生长必需的元素,也是限制自然海区不同浮游植物群落发展的重要因素之一<sup>[36-38]</sup>。硅藻是氮限制类型,通常在富含硝酸盐海域占据优势地位<sup>[39-40]</sup>。Koike等研究南极浮游生物对无机氮的代谢发现浮游植物对无机氮的吸收具有光依赖性<sup>[41]</sup>。Rijstenbil和Sinke研究中肋骨条藻氮代谢时,发现细胞碳固定被抑制会影响到氮的同化作用<sup>[42]</sup>。研究表明中肋骨条藻属于典型的氮限制类型<sup>[43-45]</sup>。DeManche等在研究中肋骨条藻对细胞内外营养盐浓度快速反应的



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库